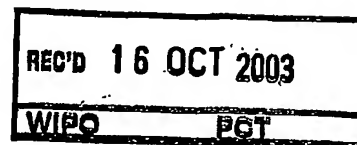


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 40 035.0

Anmeldetag: 30. August 2002

Anmelder/Inhaber: Priv. Doz. Dr. rer.nat. Bernd H. A. R e h m ,
Nottuln/DE

Bezeichnung: Biogene Polyester-Partikel definierter Größe mit
funktionalisierten Oberflächen: Herstellungsverfahren
und pharmazeutische Zubereitungen, in denen diese
enthalten sind

IPC: A 61 K 38/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 6. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

BEST AVAILABLE COPY

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Beschreibung

Biogene Polyester-Partikel definierter Größe mit funktionalisierten Oberflächen: Herstellungsverfahren und pharmazeutische Zubereitungen, in denen diese enthalten sind

Die Polyester-Nanopartikel (10-100 nm), -Submikropartikel (100-900 nm) und -Mikropartikel (1-3 μm) werden aus Wildtyp-Mikroorganismen (Eü- und Archaeobakterien z. B. *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Halobiforma haloterrestis*) oder gentechnisch veränderten Mikroorganismen der erwähnten Gruppen (z. B. *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonaden*, *Ralstonia eutropha*), die in der Lage sind Polyester aus Hydroxyfettsäuren und/oder Mercaptofettsäuren und/oder anderer Bausteine, die von Polyester-synthetisierenden Enzymen polymerisiert werden, zu synthetisieren. Unter anderen Bausteinen sind sämtliche Bausteine, die durch die Polyester-synthetisierende Enzyme zu einem Polyester polymerisiert werden können, zusammengefasst.

Entsprechende Mikroorganismen werden in geeigneten Minimal- oder Komplex-Medien mit geeigneten Vorstufensubstraten (Fettsäuren, Mercaptosäuren und Vorstufensubstrate, die zur einer Bildung von Polyester-Granula führen) kultiviert und in der spätstationären Wachstumsphase geerntet. Durch Wahl der Kultivierungsbedingungen (Vorstufensubstrate, Sequentielle Vorstufensubstratfütterung), Mikroorganismen (Wildtypen, Mutanten und gentechnisch veränderte Mikroorganismen) und der Stoffwechselflusssteuerung (Inhibitoren von Stoffwechselflüssen, Etablierung von Stoffwechselwegen durch gentechnische Veränderung) wird das mögliche Spektrum an unterschiedlichen Polyesterkernen erfasst. Der Zellaufschluss erfolgt entweder durch enzymatische oder durch mechanische Verfahren.

Die Größe der Granula wird *in vivo* durch Verwendung einer *phaP-negativen R. eutropha*-Mutanten (knock out-Mutanten, York et al., 2001) und kontrollierter Expression von Phasin-Genen (ausgehend vom *bad*-Promotor mit Arabinose als Induktor) oder durch Verwendung von rekombinanten Mikroorganismen, welche

30-08-02 6

Polyester synthetisieren können, und durch gleichzeitige kontrollierte Expression von Phasin-Genen kontrolliert. Hier werden alle mikrobiellen Systeme genutzt, die eine entsprechende Kontrolle der Granula-Größe ermöglichen. Die Phasin-Kopienzahl verhält sich grundsätzlich reziprok zur Größe der Granula (Wieczorek et al., 1995). Durch kontrollierte Erhöhung der Kopienzahl von Phasinen wird eine Abnahme des durchschnittlichen Granulum-Durchmessers bei gleichzeitiger Zunahme der Anzahl der Granula erreicht. Weiterhin wird die Größe der Granula durch die Kopienzahl der PHA-Synthase (PHA = Polyhydroxyalkanoat) und die Dauer der Verfügbarkeit der PHA-Synthase-Substrate kontrolliert. Durch Antisense-Technologie und/oder genetische Regulation und/oder Verfügbarkeit von Vorstufensubstraten wird die Bereitstellung von PHA-Synthase-Substraten kontrolliert. Weiterhin werden Granula unterschiedlicher Größe durch Gelfiltrationschromatographie und/oder Ultrafiltration und/oder Dichte-gradientenzentrifugation bezüglich der Größe fraktioniert (\varnothing 10-500 nm).

Unterschiedliche PHA-Synthasen oder Lipasen oder PHA-Depolymerasen werden mittels His-tag-Fusion und Ni-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Polyester-synthetisierenden Enzyme und Coenzym A Thioster-bildende Enzyme (z. B. Acyl-CoA-Synthetasen) werden für die *in vitro* Synthese ausgehend von geeigneten Substraten (Substratgemischen, sequentielle Verfügbarkeit von Substraten), die zu Polyester-Vorstufen umgesetzt werden können, eingesetzt. Durch Erhöhung des Verhältnisses Polyester-synthetisierender Enzyme zur Substratkonzentration wird zu dem das durchschnittliche Molekulargewicht des Polyesters verringert (Sim et al., 1997). Die Oberfläche der Granula wird nach Bedarf mit Phospholipiden und/oder Etherlipiden und/oder Proteinen versehen werden, indem diese Komponenten dem *in vitro* Synthese-Ansatz in geeigneten Konzentration hinzugegeben werden. Durch gleichzeitige Verwendung von PHA-Synthasen mit unterschiedlicher Substratspezifität in Gegenwart unterschiedlicher Substrate werden Granula mit einem Polymer-Blend als Kernstruktur gewonnen. Bei der *in vitro* Polyester-Synthese werden ebenso nach Bedarf therapeutisch wirksame Substanzen hinzugegeben, die dann im Polyester-Kern vorliegen.

Die unterschiedlichen Granula werden durch Standardverfahren aus den Bakterien bzw. dem *in vitro* Syntheseansatz gewonnen und anschließend durch

Gelfiltrationchromatographie und/oder Ultrafiltration in 5 mM Phosphatpuffer pH 7,5 und/oder Dichtegradientenzentrifugation gemäß der Größe fraktioniert.

Granula, die aus Mikroorganismen oder aus der *in vitro* Synthese gewonnen wurden, werden bezüglich der Oberfläche modifiziert. Durch Einsatz von Phospholipasen und/oder Aceton-Extraktion und/oder Detergenzien werden Phospholipide von der Granulum-Oberfläche entfernt und können durch Proteine und/oder andere amphiphile Moleküle ersetzt werden.

Funktionalisierung der Polyester-Partikel-Oberfläche

Kovalent gebundene Proteine

Im Rahmen der Erfindung getätigte Untersuchungen zeigen, dass die PHA-Synthase weder durch Behandlung mit denaturierenden Reagenzien (SDS, Harnstoff, Guanidiniumhydrochlorid, DTT) noch durch Verwendung azider Bedingungen von dem Polyester-Kern gelöst werden können, was auf eine bestehende kovalente Verknüpfung mit dem Polyestermolekül anzeigt. Der N-terminale Abschnitt der PHA-Synthasen (N-Terminus bis zum Beginn der konservierten α/β -Hydrolase-Domäne) ist äußerst variabel und wird durch gentechnische Methoden durch Funktionsproteine ersetzt werden, wobei die PHA-Synthase-Aktivität und Synthese von Granula erhalten bleibt (siehe auch Rehm et al., 2002). Folglich wird eine Funktionalisierung der Oberfläche erreicht. Ein Gemisch unterschiedlicher Fusionsproteine wird bei Bedarf gleichzeitig appliziert, so dass eine Multifunktionalisierung der Granulum-Oberfläche erzeugt wird. Die Applikation dieser Fusionsproteine erfolgt *in vitro* durch Zugabe der gereinigten Fusionsproteine zum Synthese-Ansatz bzw. *in vivo* durch Expression der Gene in dem entsprechenden Mikroorganismus, die für die Fusionsproteine kodieren.

Nicht-kovalent gebundene Proteine

Der C-Terminus (>Ala141 gemäß des Phasins PhaP aus *R. eutropha*) der Phasine ist hydrophil und wird durch Funktionsproteine ersetzt, ohne eine Verankerung in der Granulum-Oberfläche zu verhindern. Diese Verankerung beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen und ist reversibel (Hanley et al., 1999). Ein Gemisch

unterschiedlicher Fusionsproteine wird bei Bedarf gleichzeitig appliziert, so dass eine Multifunktionalisierung der Granulum-Oberfläche erzeugt wird.

Der C-Terminus (>Aminosäurerest 180 gemäß der intrazellulären PHA-Depolymerase von *R. eutropha*) der intrazellulären PHA-Depolymerasen vermittelt die Bindung des Enzyms an den Polyester-Kern der Granula (siehe auch Saegusa et al., 2001). Dieser C-terminale Abschnitt der intrazellulären PHA-Depolymerasen wird durch gentechnische Methoden an Funktionsmoleküle fusioniert und ermöglicht somit eine Funktionalisierung der Granulum-Oberfläche. Ein Gemisch unterschiedlicher Fusionsproteine wird bei Bedarf gleichzeitig appliziert, so dass eine Multifunktionalisierung der Granulum-Oberfläche erzeugt wird.

Der N-Terminus (<Aminosäurerest 140 gemäß der Granulum-assoziierten Proteine PhaI und PhaF aus *Pseudomonas oleovorans*) der Proteine PhaF und PhaI aus Pseudomonaden vermittelt die Bindung der Proteine an den Polyester-Kern der Granula (siehe auch Prieto et al., 1999). Dieser N-terminale Abschnitt jeweils der Proteine PhaF und PhaI wird durch gentechnische Methoden an Funktionsmoleküle fusioniert und ermöglicht somit eine Funktionalisierung der Granulum-Oberfläche. Ein Gemisch unterschiedlicher Fusionsproteine wird bei Bedarf gleichzeitig appliziert, so dass eine Multifunktionalisierung der Granulum-Oberfläche erzeugt wird.

Die oben angeführten Granulum-assoziierten Proteine werden ebenso durch Insertion von Epitopen gentechnisch modifiziert, um eine Antikörper-vermittelte Bindung zu erzielen. Grundsätzlich werden hier Peptid/Polypeptid-Insertionen durchgeführt, die eine spezifische Bindung vermitteln können (siehe auch Rehm und Hancock, 1996).

Kovalente Modifizierung von Aminosäureresten Granulum-assoziiierter Proteine

Granulum-assoziierte Proteine werden durch Aminosäure-spezifische chemische Reagenzien kovalent modifiziert werden. Durch diese Verknüpfung werden weitere Funktionsmoleküle wie z. B. Biotin an der Granulum-Oberfläche lokalisiert, die z. B. eine spezifische Bindung an andere Moleküle vermitteln (siehe auch Rehm et al., 1994).

Kovalente Modifizierung von Molekülen an der Oberfläche des Polyester-Kerns

Durch eine Vielzahl von Kopplungsreagenzien und/oder bifunktionellen Reagenzien werden die Moleküle, die sich an der Oberfläche des Polyester-Kerns befinden aktiviert und eine kovalente Verknüpfung mit Wirkstoffmolekülen wird durchgeführt.

Literatur

- Hanley, S.Z., Pappin, D.J.C., Rahman, D., White, A.J., Elborough, K.M., Slabas, A.R. (1999) Re-evaluation of the primary structure of *Ralstonia eutropha* phasin and implications for polyhydroxyalkanoic acid granule binding. FEBS Letters 447: 99-105
- Prieto MA, Buhler B, Jung K, Witholt B, Kessler B. (1999) PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. J Bacteriol. 181(3):858-68.
- Rehm, B.H.A., Boheim, G., Tommassen, J., Winkler, U.K. (1994) Overexpression of *algE* in *Escherichia coli*: subcellular localization, purification, and ion channel properties. J. Bacteriol. 176:5639-5647.
- Rehm, B.H.A., Hancock, R.E.W. (1996). Membrane topology of the outer membrane protein OprH from *Pseudomonas aeruginosa*: PCR-mediated site specific insertion and deletion mutagenesis. J. Bacteriol. 178:3346-3349
- Rehm, B.H.A., Antonio, R.V., Spiekermann, P., Amara, A.A., Steinbüchel, A. (2002) Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: *In vitro* evolution, site-specific mutagenesis and development of PHB synthase protein model. Biochim, Biophys. Acta, 1594:178-190.
- Saegusa, H., Shiraki, M., Kanai, C. and Saito, T. (2001) Cloning of an intracellular Poly[D(-)-3-Hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. J. Bacteriol. 183 (1), 94-100.

- Sim SJ, Snell KD, Hogan SA, Stubbe J, Rha C, Sinskey AJ. (1997) PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. *Nat Biotechnol.* 15(1):63-7.
- Wieczorek R, Pries A, Steinbüchel A, Mayer F. (1995) Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol.* 177(9):2425-35.
- York GM, Junker BH, Stubbe JA, Sinskey AJ (2001) Accumulation of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells. *J Bacteriol.* 183:4217-4226.

Patentansprüche

1. Ein Wirkstoffmolekül/Funktionsmolekül-Träger- und Lokalisierung-System bestehend aus biologisch abbaubaren Polyestern, die durch eine einfach oder mehrfach funktionalisierte Oberflächenschicht, die aus kovalent oder nicht kovalent an das Polyester gebundene Proteine und/oder aus nicht-kovalent an das Polyester gebundenen amphiphilen Molekülen besteht und die Herstellung der entsprechende Partikel
2. Das System gemäß Patentanspruch 1 besteht aus einem Polyester-Kern, dessen Polyester-Zusammensetzung sämtliche Bausteine in unterschiedlichen Verhältnissen und Anordnungen umfasst, die von Polyester-synthetisierenden Enzymen zu einem Polyoxoester oder Polythioester polymerisiert werden können
3. Das System gemäß Patentanspruch 2 liegt in Polyester-Nanopartikel (10-100 nm), -Submikropartikel (100-900 nm) und -Mikropartikel (1-3 µm) oder Filmen vor.
4. Die Partikel gemäß Patentanspruch 3 sind von Phospholipiden und/oder Etherlipiden und/oder Proteinen und/oder Lipopolysaccharide und/oder amphiphilen Molekülen, die an die Granulumboberfläche binden, umgeben und die Herstellung dieser Oberflächenschicht
5. Die Partikel gemäß Patentansprüche 2-4 werden *in vivo* in Eu- oder Archaeobakterien gebildet und durch Wahl der Kultivierungsbedingungen (Vorstufensubstrate, sequentielle Vorstufensubstratfütterung), Mikroorganismen (Wildtypen, Mutanten und gentechnisch veränderte Mikroorganismen) und der Stoffwechselseksteuerung (Inhibitoren von Stoffwechselsekflüssen, Etablierung von Stoffwechselwegen durch gentechnische Veränderung) wird die Zusammensetzung des Polyesters im Partikelkern gesteuert
6. Die Partikel gemäß Patentansprüche 2-5 werden bezüglich der Größe, durch Kontrolle des Verhältnisses von Polyester-synthetisierenden Enzymen zu polymerisierbaren Substrat und/oder durch die Kopienzahl von Phasinen, die PhaP aus *Ralstonia eutropha* oder Proteine mit PhaP-Funktion sind, gesteuert
7. Die Partikel gemäß Patentanspruch 4 sind von Proteinen umgeben, die Fusionen von Enzymen und/oder spezifische Bindung vermittelnden Proteinen

mit PHA-Synthasen und/oder PHA-Depolymerasen und/oder Phasinen und/oder Proteinen mit Phasinfunktion und/oder PHA-Regulatorproteinen darstellen

8. Die Partikel gemäß Patentansprüche 3 bis 6 werden durch Gelfiltrationschromatographie und/oder Dichtegradientenzentrifugation und/oder Ultrafiltration mit definierter Größe gewonnen
9. Die Oberfläche der Partikel gemäß Patentansprüche 4 bis 7 wird mit chemische Reagenzien aktiviert und Wirkstoffmoleküle werden über die aktivierten Stellen gebunden
10. Die Partikel gemäß Patentanspruch 7 sind von Fusionproteinen umgeben, die aus einer an die Polyester-Oberfläche bindenden Domäne und einer spezifische Funktionen vermittelnden Domäne bestehen
11. Die Funktionen gemäß Patentanspruch 10 umfassen Enzymaktivitäten und/oder Oberflächenstrukturstabilisierung und/oder Vermittlung einer spezifischen molekularen Interaktion
12. Die Kopplungsreagenzien gemäß Patentanspruch 9 gehören folgenden Gruppen an: Bis-(2-oxo-3-oxazolydiny)-Phosphonchlorid (BOP-Cl), Bromo-tris-pyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat (PyBroP), Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP), 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU), Dicyclohexyl-carbodiimide, Disuccinimidyl carbonate, 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDC), Bis-(2-oxo-3-oxazolydiny)-phosphin, Diisopropyl-carbodiimide (DIPC), 2-(1H-benzotrioxazolyl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU), 2-(5-norboren-2,3-dicarboxyimido)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TNTU), para-Nitrophenylchloroformate, and O- (N-succinimidy)-1,1,3,3- tetramethyluronium tetrafluoroborate (TSTU), Aminosäurerest modifizierende Reagenzien
13. Zur Aktivierung der Partikeloberfläche gemäß Patentanspruch 9 werden folgende Reagenzien eingesetzt: Triethylamine, N-Methylmorpholin, Pyridine, 1,8-Diazabicyclo-[5,4,0]-7undecen, N, N-Dimethylaminopyridine und N, N-Diisopropylethylamin
14. Zur Aktivierung der Partikeloberfläche gemäß Patentanspruch 9 werden folgende Additive eingesetzt: Hydroxybenzotriazole, Pentafluorophenol und N-Hydroxy-5-norboren-endo-2,3-dicarboximid.

30.09.02

13

15. Die Wirkstoffe gemäß Patentanspruch 1 oder 9 umfassen Anti-Tumor-Agenzien wie z. B. Dideoxyinosin, Floxuridin, 6-Mercaptopurin, Doxorubicin, Daunorubicin, 1-Darubicin, Cisplatin, Methotrexat, Taxol etc.; Antibiotika wie z.B. Erythromycin, Vancomycin, Oleandomycin, Ampicillin, etc.; Anticoaguranzien wie z.B. Heparin; Germizide wie z.B. ara-A, Acylguanosen, Nordeoxyguanosen, Azidothymidin, Dideoxyadenosen, Dideoxythymidin, etc.; Antiarrhythmische Agenzien; und Wirkstoffvorstufen und -derivate der angeführten Wirkstoffgruppen
16. Die Wirkstoffe gemäß Patentanspruch 1 oder 9 oder Funktionen gemäß Patentanspruch 11 sind Moleküle von biologisch aktiven Verbindungen und umfassen Peptide, Proteine, Therapeutika, Diagnostika, und nicht-biologische Moleküle wie z.B. Pestizide, Herbizide und Düngemittel
17. Peptide gemäß Patentanspruch 16 werden aus einer Gruppe ausgewählt, die Insulin, Calcitonin, ACTH, Glucagon, Somatostatin, Somatotropin, Somatomedin, Parathyroidhormon, Erythropoietin, hypothalamische Freisetzungsfaktoren, Prolactin, Thyroid-stimulierendes Hormon, Endorphine, Enkephaline, Vasopressine, nicht natürlich vorkommende Opiate, Superoxid-dismutase, Interferon, Asparaginase, Arginase, Arginindeaminase, Adenosindeaminase, Ribonuclease, Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin
18. Herstellungsverfahren für Partikel gemäß Patentanspruch 1 in dem Patentansprüche 2 bis 17 kombiniert oder unabhängig von einander berücksichtigt werden
19. Pharmazeutische Zubereitungen, die als Wirkstoff die Partikel gemäß Patentansprüche 1 bis 18 enthalten
20. Pharmazeutische Zubereitungen gemäß Patentansprüche 15 und 19, die eine immunomodulatorische, antiinfektiöse und/oder antitumorale therapeutische Wirkung aufweisen

Zusammenfassung

Biogene Polyester-Partikel definierter Größe mit funktionalisierten Oberflächen: Herstellungsverfahren und pharmazeutische Zubereitungen, in denen diese enthalten sind

Die vorliegende Erfindung beschreibt die Gewinnung biogener biokompatibler Polyester-Nanopartikel, -Submikropartikel und Mikropartikel mit definierter Größe und funktionalisierten Oberflächen sowohl mit Hilfe der Kultivierung von Mikroorganismen oder gentechnisch veränderten Mikroorganismen, die Polyester in Form von Granula (Einschlusskörpern) bilden, als auch durch *in vitro* Synthese mit Polyhydroxyalkanoat (PHA)-Synthasen und/oder Lipasen und/oder PHA-Depolymerasen. Die Partikel, die im Kern aus Polyestern mit Hydroxyfettsäuren und/oder Mercaptofettsäuren als Bausteinen bestehen können und deren Oberfläche aus Phospholipiden und/oder Etherlipiden und/oder Proteinen (insbesondere PHA-Synthasen (kovalent mit Polyester verknüpft), PHA-Depolymerasen, Phasine, PHA-Regulatorproteinen, und Fusionsproteine, die aus Anteilen der zuvor genannten Proteine und Funktionsproteinen bestehen; Funktionsproteine vermitteln zum einen z.B. die Bindung an Zielgewebe oder andere relevante Oberflächen und zum anderen eine enzymatische Aktivität. Proteine der Granula-Oberfläche können auch durch Protein-spezifische Reagenzien kovalent modifiziert werden, um die Oberfläche der Granula zu funktionalisieren. Die Granula werden durch Gelfiltrationschromatographie und/oder Ultrafiltration und/oder Dichtegradientenzentrifugation bezüglich der Größe fraktioniert (\varnothing 10-500 nm). Die Erfindung soll folgende Anwendungen umfassen: 1. Medizinische Wirkstoffe und Therapeutika sollen in den Polyesterkern der Granula eingebracht werden und durch Verwendung unterschiedlicher Polyester und/oder konzentrischer lamellarer Schichtung unterschiedlicher Polyester (Block-Copolyester) und/oder unterschiedlicher Oberflächenbeschichtung (siehe oben) und/oder ohne Oberflächenbeschichtung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit am Zielort freigesetzt werden. Insbesondere wird hier die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke für die Freisetzung von Wirkstoffen im Gehirn angestrebt. 2. Medizinische Wirkstoffe und Therapeutika können ebenso an der funktionalisierten Oberfläche immobilisiert werden 3. Landwirtschaftliche Wirkstoffe sollen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit freigesetzt werden (siehe unter 1.). 4. Biokatalysatoren (Enzyme) und/oder

spezifische Bindung vermittelnde Proteine sollen durch Fusion mit aktiver PHA-Synthase und/oder durch Fusion mit Ankersequenzen Granulumboberflächenspezifischer Proteine immobilisiert werden und für biotechnologische Biokatalyseverfahren verfügbar gemacht. Hier sollen spezifische Bindung vermittelnde Moleküle, die kovalent mit Oberflächenmolekülen verküpft werden berücksichtigt werden. Unterschiedliche Biokatalysatoren können hier an der Granulumboberfläche räumlich benachbart vorliegen und biokatalytische Verfahren, die insbesondere eine sequentielle mehrstufige und enzymatische Umsetzung erfordern, optimieren. Das Vorliegen von Bindéproteinen (z.B. Antikörperfragmenten) an der Oberfläche der Granula soll zur Separation, Orientierung und Lokalisierung der Granula in biotechnologischen Systemen genutzt werden.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.